

JC01 Rec'd PCT/PTO 01 APR 2002

Promoteurs spécifiques de l'albumen des graines de végétaux

La présente invention se rapporte au contrôle de l'expression des gènes au cours du développement de l'albumen. Elle concerne en particulier  
5 des séquences nucléotidiques promotrices permettant une expression à la fois spécifique à l'interface entre l'embryon et l'albumen et précoce au cours du développement de l'albumen.

L'albumen, formation caractéristique de la graine des Angiospermes, est un tissu nourricier pour l'embryon. C'est un tissu complexe  
10 dans sa structure et son développement, en particulier chez les céréales. La zone centrale de l'albumen consiste en de larges cellules à vacuoles, qui stockent les réserves d'amidon et de protéines, tandis que la région entourant l'embryon se distingue par des cellules plutôt petites, occupées en grande partie par du cytoplasme. On ne connaît pas à ce jour la fonction de ces  
15 cellules appelées "cellules cytoplasmiques denses" (Schel et al, 1984). En 1997, Opsahl et al ont identifié un gène exprimé spécifiquement dans cette région restreinte autour de l'embryon de maïs, gène qu'ils ont dénommé *Esr* (pour « Embryo Surrounding Region »).

20 Les auteurs de la présente invention ont maintenant isolé des séquences nucléotidiques promotrices permettant une expression des séquences codantes auxquelles elles peuvent être liées, qui est spécifique de la région de l'albumen entourant l'embryon dans les graines des Angiospermes et qui intervient en particulier dans les stades précoces du développement de  
25 l'albumen.

De telles séquences promotrices sont particulièrement utiles pour cibler ou réguler l'expression de gènes d'intérêt.

Dans le cadre d'une amélioration des plantes par transgénèse, on peut lier de manière opérante une telle séquence nucléotidique promotrice à  
30 une séquence codant pour un gène d'intérêt.

La construction nucléotidique, préférentiellement insérée dans un vecteur, peut être utilisée pour transformer des cellules végétales de manière

stable, de telle sorte que la plante ainsi transformée contienne dans son génome le gène d'intérêt associé à la séquence promotrice de l'invention.

Les graines qui se développent, par fécondation, à partir de cette plante, contiennent également dans leur génome ce transgène.

5 Du fait de son association à la séquence promotrice de l'invention, ce transgène d'intérêt ne s'exprimera que dans la région de l'albumen entourant l'embryon, c'est-à-dire dans les cellules cytoplasmiques denses telles que mentionnées précédemment.

10 L'expression du transgène débute dès les premiers jours après la pollinisation, plus précisément dès le quatrième jour après la pollinisation.

Les séquences promotrices de l'invention peuvent être avantageusement choisies parmi les séquences comprenant les séquences SEQ ID n° 1, n°2, n°3, n°4, n°5, n° 6, ou n° 7 ou toute séquence nucléotidique homologue de celles-ci.

15 La séquence SEQ ID n° 1 correspond au promoteur du gène *Esr1*.

La séquence SEQ ID n° 2 correspond au promoteur du gène *Esr2*.

20 La séquence SEQ ID n° 3 correspond au promoteur du gène *Esr3*.

La séquence SEQ ID n° 4 correspond au promoteur du gène *Esr4*.

La séquence SEQ ID n° 5 correspond à un fragment de 499 paires de bases sur SEQ ID n° 2 (nucléotides 1995-2493).

25 La séquence SEQ ID n° 6 correspond à un fragment de 507 paires de bases sur SEQ ID n° 3 (nucléotides 1202-1708).

La séquence SEQ ID n° 7 est une séquence consensus de 265 nucléotides, obtenue par comparaison entre les séquences SEQ ID n°1, n°2 et n°3.

30 Par "séquence nucléotidique homologue", on entend toute séquence nucléotidique qui diffère de la séquence SEQ ID n°1, n° 2, n° 3 n° 4 , n°5, n°6 ou n° 7, par substitution, délétion, et/ou insertion d'un ou plusieurs nucléotides, à des positions telles que ces séquences nucléotidiques

homologues conservent la propriété de promoteur spécifique des séquences SEQ ID n° 1 à n° 7.

De préférence, une telle séquence nucléotidique homologue est identique à au moins 70 % des séquences SEQ ID n° 1 à n° 7, de préférence  
5 au moins 80 %, de préférence encore au moins 95 %.

L'homologie est généralement déterminée en utilisant un logiciel d'analyse de séquences (par exemple, Sequence Analysis Software Package of the Genetics Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Avenue, Madison, WI 53705). Des séquences  
10 nucléotidiques similaires sont alignées pour obtenir le maximum de degré d'homologie (i.e. identité). A cette fin, il peut être nécessaire d'introduire de manière artificielle des espaces (« gaps ») dans la séquence. Une fois l'alignement optimal réalisé, le degré d'homologie (i.e. identité) est établi par enregistrement de toutes les positions pour lesquelles les nucléotides des deux  
15 séquences comparées sont identiques, par rapport au nombre total de positions.

De manière préférentielle, une telle séquence nucléotidique homologue hybride spécifiquement aux séquences complémentaires des séquences SEQ ID n° 1 à n° 7, dans des conditions stringentes. Les  
20 paramètres définissant les conditions de stringence dépendent de la température à laquelle 50% des brins appariés se séparent ( $T_m$ ).

Pour les séquences comprenant plus de 30 bases,  $T_m$  est définie par la relation :  $T_m = 81,5 + 0,41(\%G+C) + 16,6 \log(\text{concentration en cations}) - 0,63(\%\text{formamide}) - (600/\text{nombre de bases})$  (Sambrook et al, Molecular  
25 Cloning, A laboratory manual, Cold Spring Harbor laboratory Press, 1989, pages 9.54-9.62).

Pour les séquences de longueur inférieure à 30 bases,  $T_m$  est définie par la relation :  $T_m = 4(G+C) + 2(A+T)$ .

Dans des conditions de stringence appropriées, auxquelles les  
30 séquences aspécifiques n'hybrident pas, la température d'hybridation est approximativement de 5 à 30°C, de préférence de 5 à 10°C en dessous de  $T_m$ , et les tampons d'hybridation utilisés sont de préférence des solutions de force ionique élevée telle qu'une solution 6xSSC par exemple.

Les différentes séquences nucléotidiques de l'invention peuvent être d'origine artificielle ou non. Il peut s'agir de séquences d'ADN, obtenues par criblage de banques de séquences au moyen de sondes élaborées sur la base des séquences SEQ ID n° 1 à n° 7. De telles banques peuvent être  
5 préparées par des techniques classiques de biologie moléculaire, connues de l'homme de l'art.

Les séquences nucléotidiques selon l'invention peuvent également être préparées par synthèse chimique, ou encore par des méthodes mixtes incluant la modification chimique ou enzymatique de séquences  
10 obtenues par criblage des banques.

Les séquences nucléotidiques promotrices de l'invention sont de préférence des séquences isolées à partir de céréales, en particulier de maïs.

Les séquences nucléotidiques promotrices selon la présente invention peuvent notamment être isolées par des méthodes de PCR inversée  
15 ou de marche sur le génome (Devic et al , 1997).

Les séquences nucléotidiques promotrices de l'invention peuvent en outre comprendre ou être associées à un motif régulateur en *cis* CTACACCA, de préférence répété en tandem, ou tout autre motif comprenant une ou plusieurs bases dégénérées ayant la même fonction.  
20

La présente invention a également pour objet une construction nucléotidique, appelée cassette d'expression, comprenant une séquence nucléotidique promotrice telle que définie précédemment liée de manière opérante à au moins un gène d'intérêt.

25 Ledit gène d'intérêt peut être également associé à d'autres éléments de régulation tels que des activateurs et des séquences de terminaison de transcription (terminateurs). A titre d'exemple de terminateur utilisable dans de telles constructions, on peut citer l'extrémité 3' du gène de la nopaline synthase d'*Agrobacterium tumefaciens*.

30 Ledit gène d'intérêt peut par exemple coder pour une protéine impliquée dans le développement de l'embryon et/ou de l'albumen, la croissance cellulaire, le métabolisme des sucres (invertase) et acides gras, le flux de nutriments (transporteurs). Il peut également coder pour une protéine

toxique, ou encore pour une protéine activatrice ou inhibitrice d'autres gènes, telle qu'une protéine inhibant un facteur de transcription (domaines de répression de type engrailed (Poole et al, 1985) ou corépresseurs par exemple).

5 Selon un mode préféré, le gène d'intérêt code pour une protéine dont l'expression spécifique dans la zone entourant l'embryon permettra de jouer sur la taille de l'embryon et/ou son développement. A titre d'exemple, ce gène peut coder pour une barnase ou isopentényl-transferase.

Le gène d'intérêt peut être placé en orientation sens ou antisens.

10 La séquence nucléotidique promotrice de l'invention peut également être associée à un gène marqueur, par exemple un gène permettant de sélectionner une plante transformée d'une plante qui ne contient pas l'ADN étranger transfecté. Comme gène marqueur, on peut citer notamment un gène conférant une résistance à un antibiotique (Herrera-Estrella et al, EMBO J. 2, 15 987-995 (1983) ou une résistance à un herbicide (EP 242 246).

L'invention a également pour objet tout vecteur nucléotidique, tel qu'un plasmide, utilisable pour la transformation de cellules hôtes, caractérisé en ce qu'il comprend une cassette d'expression telle que définie précédemment. La construction de vecteurs d'expression pour la 20 transformation est à la portée de l'homme du métier suivant les techniques standards.

L'invention a également pour objet une cellule hôte de plante Angiosperme, notamment de céréale, transformée par un vecteur selon l'invention.

25 L'invention concerne en outre une plante transgénique ou partie de plante transgénique, notamment semence, fruit et pollen, générée à partir d'une telle cellule.

Parmi les cellules susceptibles d'être transformées selon le procédé de l'invention, on peut citer à titre d'exemples des cellules de plantes 30 de grandes cultures (maïs, blé, colza, tournesol, pois, soja, orge..) ou des plantes potagères et fleurs. Préférentiellement, on peut choisir des plantes connues pour contenir de grandes réserves (protéiques, glucidiques et lipidiques), notamment les plantes céréalières ou les plantes oléagineuses.

Les plantes hybrides obtenues par le croisement de plantes selon l'invention, font aussi partie de l'invention.

L'invention a également pour objet un procédé d'obtention d'une plante Angiosperme présentant des qualités agronomiques ou nutritionnelles améliorées, comprenant les étapes consistant à :

- transformer au moins une cellule de plante Angiosperme par un vecteur tel que défini précédemment ;
- cultiver la cellule ainsi transformée de manière à générer une plante contenant dans son génome une cassette d'expression selon l'invention.

La transformation de cellules végétales peut être réalisée par les techniques connues de l'homme du métier.

On peut citer notamment les méthodes de transfert direct de gènes telles que la microinjection directe dans des embryoïdes de plante (Neuhaus et Coll., 1987), l'infiltration sous vide (Bechtold et al., 1993) ou l'électroporation (Chupeau et Coll., 1989) ou encore la précipitation directe au moyen de PEG (Schocher et Coll., 1986) ou le bombardement par canon de particules recouvertes de l'ADN plasmidique d'intérêt (Fromm M. et al., 1990).

On peut également infecter la plante par une souche bactérienne notamment d'*Agrobacterium*. Selon un mode de réalisation du procédé de l'invention, les cellules végétales sont transformées par un vecteur selon l'invention, ledit hôte cellulaire étant susceptible d'infecter lesdites cellules végétales en permettant l'intégration dans le génome de ces dernières, des séquences nucléotidiques d'intérêt initialement contenues dans le génome de vecteur susmentionné. Avantageusement, l'hôte cellulaire susmentionné utilisé est *Agrobacterium tumefaciens*, notamment selon la méthode décrite dans l'article d'An et al, (1986), ou encore *Agrobacterium rhizogenes*, notamment selon la méthode décrite dans l'article de Guerche et al, (1987).

Par exemple, la transformation des cellules végétales peut être réalisée par le transfert de la région T du plasmide circulaire extra-chromosomique inducteur de tumeurs Ti d'*Agrobacterium tumefaciens*, en utilisant un système binaire (Watson et al, 1994). Pour ce faire, deux vecteurs sont construits. Dans l'un de ces vecteurs, la région T a été éliminée par délétion, à l'exception des bordures droite et gauche, un gène marqueur étant

inséré entre eux pour permettre la sélection dans les cellules de plantes. L'autre partenaire du système binaire est un plasmide Ti auxiliaire, plasmide modifié qui n'a plus de région T mais contient toujours les gènes de virulence *vir*, nécessaires à la transformation de la cellule végétale.

5                    Selon un mode préféré, on peut utiliser la méthode décrite par Ishida et al (1996) pour la transformation des Monocotylédones.

                  Selon un autre protocole, la transformation est réalisée selon la méthode décrite par Finer et al, (1992) utilisant le canon à particules de tungstène ou d'or.

10

                  L'invention a également pour objet l'utilisation des séquences nucléotidiques promotrices visées précédemment, dans des constructions moléculaires destinées à améliorer la qualité agronomique, alimentaire, ou industrielle d'une plante, en jouant notamment sur la taille de l'embryon ou de  
15 l'albumen et/ou son développement.

                  En effet, une action précoce et spécifique sur le développement des tissus de l'embryon et de l'albumen peut être recherchée : selon la taille relative de l'un ou l'autre tissu, il sera possible d'obtenir des graines ou fruits enrichis en amidon (gros albumen) et/ou huile (gros embryon), via l'utilisation, respectivement de gènes stimulateurs (hormone du cycle cellulaire par  
20 exemple) ou de gènes inhibiteurs (protéine toxique ou inhibiteur de transcription, par exemple). Des albumens sans embryons pourraient également être obtenus selon ce modèle, pour des applications industrielles en amidonnerie et semoulerie.

25                    A titre d'exemple, l'utilisation de gènes codant pour des hormones (cytokinines, auxines) du cycle cellulaire, sous contrôle des promoteurs décrits selon l'invention, permettrait de modifier les processus de cellularisation et, de façon corrélée, le développement de l'albumen, au vu des travaux de R. J. Scott (1998).

30                    Une action sur l'accumulation de nutriments dans l'embryon et de l'albumen peut être également recherchée, en utilisant par exemple comme gènes d'intérêts, des gènes codant pour des transporteurs de nutriments (sucres notamment) aux interfaces plante mère/albumen et albumen/embryon,

ou des gènes codant pour des inhibiteurs de ces transports, pour une accumulation différentielle de nutriments dans l'albumen ou l'embryon.

L'invention vise donc également des procédés pour modifier les qualités agronomiques et/ou nutritionnelles d'une plante, par une action ciblée et précoce sur le développement de l'embryon/albumen, utilisant la transformation des plantes avec un vecteur selon l'invention. En particulier, elle s'intéresse à la modification de la taille et/ou du développement de l'embryon/l'albumen. Elle vise également l'altération du développement de l'embryon, en vue de produire des grains sans embryons pour les céréales notamment, présentant un intérêt pour les industries de l'amidonnerie et de la semoulerie.

L'invention a plus précisément pour objet l'utilisation d'une cassette d'expression telle que définie précédemment, pour l'obtention d'une plante Angiosperme transgénique présentant des qualités agronomiques ou nutritionnelles améliorées.

De manière avantageuse, la plante transgénique obtenue peut produire des graines à teneurs en amidon ou en huile modifiées en comparaison avec une plante non transformée.

L'invention concerne également l'utilisation des plantes transgéniques obtenues selon l'invention, ou parties de ces plantes, notamment semences, grains et fruits pour la préparation de produits dérivés, notamment de produits alimentaires.

Rentrent également dans l'invention les produits obtenus, que ce soit des semences enrichies en huile, farines de semences ou grains enrichis en amidon ou en huile.

L'invention a enfin pour objet toute composition pour l'alimentation humaine ou animale préparée à partir desdits produits obtenus.

Les figures et exemples ci-après illustrent l'invention sans en limiter sa portée.



### LEGENDE DES FIGURES

- La figure 1 représente un schéma illustrant les étapes du clonage des promoteurs *Esr*.
- La figure 2 représente la carte de restriction du plasmide L82/34, comprenant notamment le promoteur *pEsr1* fusionné à *Gus*.
- La figure 3 représente la carte de restriction du plasmide L124/19, comprenant notamment le promoteur *pEsr2* fusionné à *Gus*.
- La figure 4 représente la carte de restriction du plasmide L127a5, comprenant notamment le promoteur *pEsr3* fusionné à *Gus*.
- La figure 5 représente la carte de restriction du plasmide L78a1, comprenant notamment le promoteur *pEsr1* fusionné à *lpt*.
- La figure 6 représente la carte de restriction du plasmide L125a2, comprenant notamment le promoteur *pEsr2* fusionné à *lpt*.
- La figure 7 représente la carte de restriction du plasmide L77a101, comprenant notamment le promoteur *pEsr1* fusionné à *Barnase*.
- La figure 8 représente la carte de restriction du plasmide L126a3, comprenant notamment le promoteur *pEsr2* fusionné à *Barnase*.
- La figure 9 représente une comparaison des séquences des promoteurs des gènes *Esr1*, *Esr2* et *Esr3* (respectivement *prEsr1*, *prEsr2* et *prEsr3*, ou SEQ ID n° 1, SEQ ID n° 2 et SEQ ID n° 3), les parties conservées étant alignées.
- La figure 10 représente la carte de restriction du plasmide pWP280.
- La figure 11 représente la carte de restriction du plasmide L129/46, comprenant notamment le promoteur *pEsr2* fusionné à la séquence *Esr2* en antisens.

## EXEMPLES

### EXEMPLE 1 :

#### **Expression quantitative *Esr1*, 2, 3**

5 Les travaux de Opsahl-Ferstad et al. (1997) ont permis d'identifier par "differential display" un amplicon spécifique de l'albumen *Esr<sub>a</sub>1* (numéro d'accès sur la base de données EMBL : X98495) et d'isoler, par criblage de banques génomiques et complémentaires sur lignée hybride HD5\*HD7 (Barloy et coll., 1989) et lignée A188 ( Gerdes et Tracy, 1993 ) respectivement, des  
10 clones correspondants. A partir des séquences génomiques *Esr1g1* (numéro d'accès sur EMBL : X98497) et *Esr2g1* (numéro d'accès sur EMBL : X98499) et *Esr3g2* (numéro d'accès sur EMBL : X99970) notamment, trois gènes *Esr1*, *Esr2* et *Esr3* ont pu être mis en évidence.

Les auteurs de la présente invention ont évalué les contributions  
15 relatives d'expression de chacun des gènes *Esr* grâce à des expériences de RT-PCR, digestion par enzymes de restriction et quantification selon les méthodes connues de l'homme de métier, à partir de matériel JAP 7 et JAP 9 (Jour Après Pollinisation).

La quantification des différentes bandes identifiées sur gel de  
20 migration révèle des contributions relatives de 18 %, 53 % et 29 % en moyenne, pour les transcrits de *Esr1*, *Esr2* et *Esr3*, respectivement. Le promoteur de *Esr2* permet donc une expression quantitative la plus forte du gène qu'il contrôle.

25

### EXEMPLE 2 :

#### **Isolement et clonage des séquences promotrices**

Comme illustré dans la figure 1, des fragments contenant les  
phases de lecture ouvertes d'*Esr1*, *Esr2* et *Esr3* (Opsahl et al, 1997) ainsi que  
30 des séquences en amont et en aval ont été sous-clonés dans le plasmide pBluescript SK+ (Stratagene) selon les méthodes décrites dans Sambrook et al (1989). Ont résulté le plasmide L23/7 contenant un fragment Sall de 2,1 kb de  $\lambda$ *Esr1g1*, le plasmide L33/1 contenant un fragment BamHI de 3,4 kb de

λEsr2g1, le plasmide L33/10 contenant un fragment BamHI de 1,9 kb de λEsr2g1 et le plasmide L102c24 contenant un fragment HindIII de 4,5 kb de λE1-111. Des sites XbaI situés juste en amont de la phase de lecture ouverte (TCTAGATTCCATG) ont permis de différencier les promoteurs putatifs des phases de lecture ouvertes respectives. En particulier, le fragment Sall/XbaI de 0,53 kb de L23/7 a été désigné comme promoteur putatif d'Esr1, le fragment HindIII/BamHI de 2,35 kb de L33/1 (partie amont du promoteur) et le fragment BamHI/XbaI de 0,14 kb de L33/10 (partie aval du promoteur), celui du promoteur putatif d'Esr2, le fragment HindIII/XbaI de 1,71 kb, celui du promoteur putatif d'Esr3 et le fragment XbaI/XbaI de 1,62 kb comprenant le promoteur putatif d'Esr4. Un promoteur Esr2 fonctionnel de 2,49 kb a été reconstitué à partir du fragment HindIII/BamHI de 2,35 kb de L33/1 et du fragment BamHI/XbaI de 0,14 kb de L33/10, dans un plasmide de base de type pBSSK+ (Stratagène). L'orientation des flèches sur la figure 1 représente l'orientation 5'-3'.

### **EXEMPLE 3 :**

#### **Structure des séquences en amont des gènes *Esr***

Des comparaisons entre les séquences des régions 5' ont montré deux types d'homologies : une séquence hautement conservée qui correspond à une séquence proximale de 265 paires de bases et des séquences de rétrotransposons dans la partie distale. Comme les séquences de rétrotransposons sont dans des orientations et positions différentes dans les trois promoteurs, elles ne semblent pas jouer un rôle dans l'expression des gènes Esr. Par conséquent, les 265 paires de bases contiendraient tout l'information *cis* nécessaire à une expression de gènes spécifique de la région entourant l'embryon.

La séquence consensus (SEQ ID n° 7) a été obtenue après alignement des trois séquences nucléotidiques promotrices et utilisation du logiciel Sequencher 3.1 de Genes Codes Corporation (Ann. Arbor, MI 48106).

Les bases dégénérées sont décrites dans Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry (1985) : Nomenclature for

incompletely specified bases in nucleic acid sequences. European Journal of Biochemistry 150:1-5.

En particulier,

B=C, G ou T mais pas A

5 D=A, G ou T mais pas C

H=A, C ou T mais pas G

K=G ou T

M=A ou C

N=G, A, T ou C

10 R=G ou A

S=C ou G

V=A, C, ou G mais pas T

W=A ou T

X=G, A, T ou C

15 et Y=C ou T.

On observe également une homologie entre les régions proximales qui s'étend sur environ 500 paires de bases entre le promoteur de *Esr2* et celui de *Esr3*, comme défini par les séquences SEQ ID n° 5 et n° 6.

La présence d'éléments agissant en cis est recherchée parmi les  
20 séquences conservées, la plus remarquable étant CTACACCA, en tandem juste 50 bases en amont de la phase ouverte de lecture (figure 9). Cette séquence est un bon candidat pour être un élément responsable d'une expression génique tissu-spécifique. La première de ces répétitions est d'ailleurs placée dans la boucle de la répétition inversée la plus importante  
25 trouvée dans les trois promoteurs. Les séquences répétées plus de deux fois ne sont conservées qu'entre les promoteurs *pEsr2* et *pEsr3*, dans la région manquante de *Esr1* : par exemple les séquences ATTCT et TTTTA, chacune étant répétée quatre fois, potentiels enhancers de transcription au vu de l'expression plus faible de *Esr1* (figure 9).

30 Pour démontrer la fonctionnalité des éléments *cis*, des construits comprenant des séquences nucléotidiques promotrices délétées, fusionnées à *GUS*, ont été préparées.

A titre d'exemple, deux techniques ont été utilisées pour créer des délétions du promoteur Esr2 :

- par digestion extensive de 5' vers 3' sur le fragment HindIII-XbaI à l'aide du kit Erase-a-base™ de Promega (constructions L140).

5                   - par amplification PCR de fragments du promoteur (constructions L194).

Les plasmides L140 et L194 contiennent des promoteurs Esr2 délétés fusionnés à un gène rapporteur Gus et un terminateur, selon les techniques décrites à l'exemple suivant.

10                   Pour l'étape de transformation, les fragments contenant les construits 'promoteurs Esr2 délétés - Gus -ter' ont été transférés dans un autre plasmide contenant le construit 'promoteur ubiquitin-luciferase-ter', ce dernier servant de standard interne pour quantifier l'activité Gus et corriger l'effet position de l'insertion du transgène dans le génome sur l'expression, variable  
15 d'une plante transformée à l'autre.

Sont répertoriés dans le tableau 1 suivant les fragments du promoteur Esr2 issus de ces délétions.

Tableau 1 :

Technique de délétion choisie	Fragment restant du promoteur Esr2*
Digestion kit (L140)	985-2493
	1254-2493
	1865-2493
	1874-2493
	1880-2493
	2077-2493
Amplification PCR (L194)	2163-2493
	2275-2493
	2373-2493

20

\* La numérotation du promoteur Esr2 est basée sur la séquence pEsr2 présentée en annexe (SEQ ID n° 2), qui va de HindIII (AAGCTT ou A = position 1) à XbaI (TCTAGA ou A = position 2493)

Pour démontrer la fonctionnalité des séquences nucléotidiques promotrices décrites ci-dessus, les inventeurs les ont clonées en amont du gène rapporteur GUS et ont utilisé les construits obtenus pour la transformation  
5 de plantes.

De manière préférée, les promoteurs délétés *Esr2* ont été obtenus selon les protocoles suivants :

Premièrement, des délétions de 5' vers 3' ont été effectuées à l'aide de l'exonucléase III. Le plasmide L124/19 contenant le promoteur du  
10 gène *Esr2* couplé au gène de la  $\beta$ -glucuronidase décrit à l'exemple 4.1 a été digéré par HindIII pour générer un site d'initiation des délétions et par PstI pour créer un site de protection contre l'action de l'exonucléase III. Les délétions ont été effectuées avec le kit Erase-a-base™ (Promega).

Deuxièmement, des fragments de promoteur ont été amplifiés à  
15 l'aide de l'amorce ESRX (5'GGGGTCTAGACTGTGAAGCTATTTTCCA3' (SEQ ID n° 8)) contenant le site de restriction XbaI (souligné) et ESRH1 (5'GGGGAAGCTTTACATTCTTGCCATAACATA3' (SEQ ID n° 9)), ESRH2 (5'GGGGAAGCTTTTCATCAATAATGCCTCATT3' (SEQ ID n° 10)) ou ESRH3 (5'GGGGAAGCTTTAATTTCTTACTTCCTATCT3' (SEQ ID n° 11)) contenant  
20 le site de restriction HindIII (souligné). Les produits d'amplification digérés par XbaI et HindIII ont remplacé le promoteur *Esr2* entier en amont du gène de la  $\beta$ -glucuronidase dans le plasmide L124/19.

Les promoteurs délétés associés au gène de la  $\beta$ -glucuronidase ont ensuite été clonés dans un plasmide contenant le gène de la luciférase sous le contrôle  
25 du promoteur de l'actine du riz. Ce dernier a été obtenu par clonage du fragment XhoI/NcoI du plasmide pAct1-F4 (Mc Elroy D. et al., Mol Gen Genet., 231 :150-160, 1991) correspondant au promoteur et premier intron de l'actine du riz, dans un plasmide de type pGP214 contenant le gène de la luciférase et le terminateur de la nopaline synthase (Twell D. et al., Development 109, 705-  
30 713, 1990), digéré par Sall/NcoI. Un adaptateur contenant les sites de restriction Sall et NotI, formés des nucléotides 5'GGCCAGTCGACAAAGCGGCCGCATGCA3' (SEQ ID n° 12) et 5'TCAGCTGTTTCGCCGGCGT3' (SEQ ID n° 13) a été introduit dans le

plasmide obtenu, digéré par NotI et PstI (plasmide L210). Les fragments Sall/NotI contenant les promoteurs délétés associés au gène de la  $\beta$ -glucuronidase ont été clonés dans le plasmide L210 digéré par Sall et NotI.

5

#### **EXEMPLE 4 :**

##### **Préparation des construits chimériques**

Toutes les constructions peuvent être réalisées notamment selon les méthodes décrites dans Sambrook et al. (1989). Les adaptateurs, pouvant être utilisés à titre d'exemple pour cloner ces fragments en amont des différents gènes effecteurs, sont décrits dans les cartes de restriction des plasmides correspondantes.

10

##### **4-1 Construits chimériques GUS**

Le plasmide L23/7 (Esr1) a été délété d'un fragment SacI contenant des sites de restriction non souhaitables. Puis un fragment XbaI/EcoRI de 2164 paires de bases du plasmide pBI101 (Jefferson et al., 1987) contenant un gène *Gus* (codant pour la  $\beta$ -glucuronidase mais dépourvu de promoteur) et une séquence terminatrice *nos*, a été introduit. Le nouveau plasmide ainsi formé a alors été digéré par XhoI et le produit de digestion contenant la région promotrice associée au gène *Gus* et positionnée en amont de ce dernier, a été sous cloné dans le vecteur pBCKS+ (Stratagene) de manière à ce que le promoteur soit à proximité de la zone d'hybridation de l'amorce T7, permettant ainsi l'obtention du plasmide L82/34 (figure 2, tableau 2).

15

20

25

Selon un protocole semblable et avec les enzymes de restriction indiquées dans les figures correspondantes, ont pu être obtenus les plasmides L124/19 (pEsr2-GUS, figure 3, tableau 3) et L127a5 (pEsr3-GUS, figure 4, tableau 4).

30

Il est également possible d'utiliser d'autres gènes rapporteurs en remplacement de GUS, par exemple la GFP (Green Fluorescent Protein, Siemering KR et al., 1996), pour confirmer les résultats obtenus avec GUS.

Selon un protocole semblable à celui décrit précédemment, le fragment HindIII-XbaI du promoteur pEsr2 a été fusionné à la séquence codant pour la GFP.

Tableau 2 : Caractéristiques du plasmide L82/34

Fragment	Position	Référence
pEsr1	741-1272	
Gus	1302-3107	
ter nos	3181-3434	
cat	5878-5223	
pBCKS+	1-740	Stratagene
L23/7 (pEsr1)	741-1272	Opsahl-Ferstad et al, 1997* et cet exemple
pBI101	1273-3436	Jefferson et al, 1987
L23/7 (en amont)	3437-3763	Opsahl-Ferstad et al, 1997 et cet exemple
pBSSK+	3764-3769	Stratagene
pBCKS+	3770-6428	Stratagene

5

\* l'insert correspond au fragment Esr1g1 dessiné dans la figure 4 d'Opsahl-Ferstad et al, 1997

Tableau 3 : Caractéristiques du plasmide L124/19

10

Fragment	Position	Référence
pEsr2	689-3175	
Gus	3205-5010	
ter nos	5084-5337	
bla	7441-6584	
pBSSK+	1-674	Stratagene
Linker JFB 34	675-688	cet exemple <sup>1)</sup>
L33/1 (pEsr2')	689-3037	cet exemple **
L33/10 (pEsr2'')	3038-3175	Opsahl-Ferstad et al, 1997 et cet exemple**
pBI101	3176-5339	Jefferson et al, 1987
linker JFB56	5340-5346	cet exemple <sup>2)</sup>
pBSSK+	5347-7566	Stratagene

\*\* les inserts sont présentés en partie comme fragment Esr2g1 dans la figure 4 de Opsahl-Ferstad et al, 1997

<sup>1)</sup> adaptateur JFB34 : 5' TCGACTGCAGCCCA 3' (SEQ ID n° 14)

3' GACGTCGGGTTCGA 5' (SEQ ID n° 15)

<sup>2)</sup> adaptateur JFB56 : 5' CTAGACCCGAATTCGC 3' (SEQ ID n° 16)

3' TGGGCTTAAGCGCCGG 5' (SEQ ID n° 17)

15



Tableau 4 : Caractéristiques du plasmide L127a5

Fragment	Position	Référence
pEsr3	689-2390	
Gus	2420-4225	
ter nos	4229-4552	
bla	6656-5799	
Pbssk+	1-674	Stratagene
Linker JFB 34	675-688	cet exemple
L102c24 (pEsr3)	689-2390	cet exemple
pBI101	2391-4554	Jefferson et al, 1987
linker JFB56	4555-4561	cet exemple
pBSSK+	4562-6781	Stratagene

5

**4-2 Construits chimériques lpt**

Le gène lpt code pour l'isopentényl-transférase, qui est une enzyme impliquée dans la synthèse de la cytokinine, phytohormone jouant un rôle dans la croissance cellulaire végétale. La séquence du gène a été déterminée par Heidekamp F. et al (1983). Des travaux antérieurs ont montré par ailleurs que cette séquence, sous le contrôle d'un promoteur spécifique de l'ovule permettait d'augmenter le contenu en matière sèche dans le fruit, chez la tomate Martineau B. et al. (1995).

Selon les méthodes de clonage décrites ci-dessus et avec les fragments d'acides nucléiques et enzymes de restriction indiquées dans les figures correspondantes, ont pu être préparés des construits pEsr1-lpt (figure 5, tableau 5) et pEsr2-lpt (figure 6, tableau 6). Il est également possible d'obtenir un construit pEsr3-lpt, selon le même protocole. Pour la préparation de ces construits, des sites NcoI (CCATGG) chevauchant le codon ATG du début de la phase de lecture ouverte ont été utilisés au lieu des sites XbaI.

Tableau 5 : Caractéristiques du plasmide L78a1

Fragment	Position	Référence
pEsr1	310-844	
ipt	846-1565	
ter ipt	1566-1850	
bla	2963-3823	
pUC118	1-231-	Boehringer
L23/7 (pEsr1)	232-844	Opsahl-Ferstad et al, 1997 et cet exemple
mutation ponctuelle	845	Zhang et al, 1996
pRZ1	846-1883	Zhang et al, 1995
pUC118	1884-4763	Boehringer

5

Tableau 6 : Caractéristiques du plasmide L125a2

Fragment	Position	Référence
pEsr2	689-3183	
ipt	3185-3904	
ter ipt	3905-4189	
bla	6309-5449	
pBSSK+	1-674	Stratagene
Linker JFB 34	675-688	cet exemple
L33/1 (pEsr2')	689-3037	cet exemple
L33/10 (pEsr2'')	3038-3183	Opsahl-Ferstad et al, 1997 et cet exemple
mutation ponctuelle	3184	Zhang et al, 1996
pRZ1	3185-4198	Zhang et al, 1995
adaptateur JFB56	4199-4214	cet exemple
pBSSK+	4215-6434	Stratagene

#### 4-3 Construits chimériques barnase

Le gène barnase code pour une RNase. Ce gène a été isolé à partir de *Bacillus amyloliquefaciens* (Hartley, 1988). Son utilisation pour créer des plantes mâles stériles a été décrite dans la demande EP 344 029 et publiée par Mariani et al (1990).

Dans le cadre de l'invention, les plasmides L77a101 (pEsr1~barnase) et L126a3 (pEsr2~barnase) décrits aux figures 7 (tableau 7) et 8 (tableau 8) ont été obtenus à partir du plasmide 'promoteur A6~barnase' décrit dans WO 92/11379, par le remplacement du pA6 par les promoteurs

pEsr1 et pEsr2 respectivement, selon les techniques connues de l'homme de métier.

On peut également obtenir un construit pEsr3-Barnase, selon un protocole semblable.

5

Tableau 7 : Caractéristiques du plasmide L77a101

Fragment	Position	Référence
pEsr1	80-605	
Barnase	613-945	
ter CaMV	1571-2257	
bla	4324-3467	
pA3	I-28	Scott et al, 1992
L23/7 (pEsr1)	29-605	Opsahl-Ferstad et al, 1997 et cet exemple
pA3	606-4473	Scott et al, 1992

Tableau 8 : Caractéristiques du plasmide L126a3

Fragment	Position	Référence
pEsr2	43-2529	
Barnase	2537-2869	
ter CaMV	3495-4181	
bla	6248-5391	
pA3	I-28	Scott et al, 1992
linker JFB34	29-42	cet exemple
L33/1 (pEsr2')	43-2391	cet exemple
L33/10 (pEsr2'')	2392-2529	Opsahl-Ferstad et al, 1997 et cet exemple
pA3	2530-6397	Scott et al, 1992

10

#### 4-4 Construit chimérique antiEsr2

Le promoteur Esr2 fonctionnel reconstitué (2,49kb) décrit à l'exemple 2 et choisi préférentiellement au vu des résultats d'expression quantitative décrits à l'exemple 1, a été fusionné à la séquence Esr2g2 (Opsahl et al., 1997) prise en orientation antisens, elle-même fusionnée au terminateur Nos.

De manière préférée, le construit chimérique contenant le gène *Esr2* en antisens sous contrôle de son propre promoteur a été obtenu selon le protocole suivant :

20

Dans un plasmide dérivé du pJIT30 contenant le promoteur 35S, un site multiple de clonage et la séquence terminateur du virus de la mosaïque du chou (Guerineau F. et al., Plant Mol Biol, 15 : 127-136, 1990), un adaptateur contenant un site *SpeI* et formé des oligonucléotides  
5 (5'GATCCACTAGTCCCG (SEQ ID n° 18)) et (5'AATTCGGGACTAGTG (SEQ ID n° 19)) a été inséré entre des sites *Bam*HI et *Eco*RI. Le fragment *Eco*RI/*SpeI* du plasmide L42 a14 (Opsahl-Ferstad et coll., 1997) a été inséré dans le plasmide décrit précédemment. La construction ainsi obtenue contenait le gène *Esr2* en orientation antisens sous le contrôle du promoteur  
10 35S (plasmide L79 b5).

Le promoteur 35S a été supprimé dans le plasmide L79 b5 par restriction par *SacI* et *Hind*III, et remplacé par un adaptateur contenant les sites de restriction *Hind*III et *NotI* et formé des oligonucléotides  
15 (5'AAGCTTTTTGCGGCCGC (SEQ ID n° 20)) et (5'TCGAGCGGCCGCAAAAAGCTTAGCT (SEQ ID n° 21)). Le promoteur *Esr2* sous forme d'un fragment *Hind*III/*NotI* de 2,44 kb a été introduit dans cet adaptateur. La construction ainsi obtenue contient le gène *Esr2* en orientation antisens sous le contrôle de son propre promoteur (plasmide L129/46 (cf figure 11)).

20 Selon un protocole semblable, on peut obtenir les construits comprenant le promoteur *Esr2* fusionné aux séquences antisens *Esr1* et *Esr3* respectivement. Il est également possible d'obtenir le même type de construits chimériques avec les autres promoteurs *Esr* selon l'invention.

Des construits comprenant le promoteur constitutif 35S fusionné  
25 aux séquences antisens *Esr* décrites ci-dessus ont également été obtenus.

#### **EXEMPLE 5 :**

**Obtention de plantes transgéniques (nécessité de la  
30 transformation stable du maïs)**

Des expériences d'expression transitoire utilisant la transformation par bombardement de cellules végétales, avec des construits chimériques p*Esr*-GUS et promoteur constitutif-Gus respectivement, n'ont pas

donné de résultats mettant en évidence la spécificité d'expression des promoteurs testés : aucune activité GUS n'a été visualisée dans la zone définie par les cellules Esr. La petite taille de cette zone et d'autres particularités propres pourraient expliquer le fait que la technique est inadaptée en conditions standards pour une expression transitoire. A titre d'exemple, les promoteurs constitutifs testés en contrôle sont les promoteurs actine de riz (McElroy et al., 1992), ubiquitine de maïs (Christensen et al., 1996), Adh de maïs (Dennis et al., 1984) et 35S (Odell et al., 1985), ont donné une coloration bleue dans tout l'albumen, démontrant la fonctionnalité du système de transformation, mais pas dans la zone entourant l'embryon, ce qui confirme l'inadaptation du système à cette zone.

La transformation visant une expression stable devenait donc nécessaire pour étudier la spécificité d'expression des promoteurs selon l'invention.

#### **5-1 Canon à particules**

La méthode utilisée repose sur l'utilisation d'un canon à particules identique à celui décrit par J. Finer (1992). Les cellules cibles sont des cellules indifférenciées en divisions rapides ayant conservé une aptitude à la régénération de plantes entières. Ce type de cellules compose le cal embryogène (dit de type II) de maïs. Ces cals sont obtenus à partir d'embryons immatures de génotype Hill selon la méthode et sur les milieux décrits par Armstrong (Maize Handbook ; 1994 M. Freeling, V. Walbot Eds ; pp.665-671). Ces fragments des cals d'une surface de 10 à 20 mm<sup>2</sup> ont été disposés, 4h avant bombardement, à raison de 16 fragments par boîte au centre d'une boîte de Petri contenant un milieu de culture identique au milieu d'initiation, additionné de 0,2 M de mannitol + 0,2 M de sorbitol. Les plasmides décrits dans les exemples précédents et portant les gènes à introduire, sont purifiés sur colonne Qiagen<sup>R</sup> en suivant les instructions du fabricant. Ils sont ensuite précipités sur des particules de tungstène (M10) en suivant le protocole décrit par Klein (1987). Les particules ainsi enrobées sont projetées vers les cellules cibles à l'aide du canon et selon le protocole décrits par J. Finer (1992). Les boîtes de cals ainsi bombardées sont ensuite scellées à l'aide de Scellofrais<sup>R</sup>

puis cultivées à l'obscurité à 27°C. Le premier repiquage a lieu 24h après, puis tous les quinze jours pendant 3 mois sur milieu identique au milieu d'initiation additionné d'un agent sélectif. On obtient après 3 mois ou parfois plus tôt, des cals dont la croissance n'est pas inhibée par l'agent sélectif, habituellement et  
5 majoritairement composés de cellules résultant de la division d'une cellule ayant intégré dans son patrimoine génétique une ou plusieurs copies du gène de sélection. La fréquence d'obtention de tels cals est d'environ 0,8 cal par boîte bombardée.

Ces cals sont identifiés, individualisés, amplifiés puis cultivés de  
10 façon à régénérer des plantules, en modifiant l'équilibre hormonal et osmotique des cellules selon la méthode décrite par Vain et al. (1989). Ces plantes sont ensuite acclimatées en serre où elles peuvent être croisées pour l'obtention d'hybrides ou autofécondées.

## 15 5-2. Transformation par *Agrobacterium*

Une autre technique de transformation utilisable dans le cadre de l'invention utilise *Agrobacterium tumefaciens*, selon le protocole décrit par Ishida et al (1996), notamment à partir d'embryons immatures de 10 jours après la fécondation. Tous les milieux utilisés sont référencés dans la  
20 référence citée. La transformation débute avec une phase de co-culture où les embryons immatures des plantes de maïs sont mis en contact pendant au moins 5 minutes avec *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404 contenant les vecteurs superbinaires. Le plasmide superbinaire est le résultat d'une recombinaison homologue entre un vecteur intermédiaire porteur de l'ADN-T  
25 contenant le gène d'intérêt et/ou le marqueur de sélection dérivé des plasmides décrits dans les exemples précédents, et le vecteur pSB1 de Japan Tobacco (EP 672 752) qui contient : les gènes virB et virG du plasmide pTiBo542 présent dans la souche supervirulente A281 d'*Agrobacterium tumefaciens* (ATCC 37349) et une région homologue retrouvée dans le vecteur  
30 intermédiaire permettant cette recombinaison homologue. Les embryons sont ensuite placés sur milieu LSAs pendant 3 jours à l'obscurité et à 25°C. Une première sélection est effectuée sur les cals transformés : les cals embryogènes sont transférés sur milieu LSD5 contenant de la phosphinotricine

à 5 mg/l et de la céfotaxime à 250 mg/l (élimination ou limitation de la contamination par *Agrobacterium tumefaciens*). Cette étape est menée 2 semaines à l'obscurité et à 25°C. La deuxième étape de sélection est réalisée par transfert des embryons qui se sont développés sur milieu LSD5, sur milieu  
5 LSD10 (phosphinotricine à 10 mg/l) en présence de céfotaxime, pendant 3 semaines dans les mêmes conditions que précédemment. La troisième étape de sélection consiste à exciser les cals de type I (fragments de 1 à 2 mm) et à les transférer 3 semaines à l'obscurité et à 25°C sur milieu LSD 10 en présence de céfotaxime.

10 La régénération des plantules est effectuée en excisant les cals de type I qui ont proliféré et en les transférant sur milieu LSZ en présence de phosphinotricine à 5 mg/l et de céfotaxime pendant 2 semaines à 22°C et sous lumière continue.

Les plantules ayant régénéré sont transférées sur milieu RM + G2  
15 contenant 100mg/l d'Augmentin pendant 2 semaines à 22°C et sous illumination continue pour l'étape de développement. Les plantes obtenues sont alors transférées au phytotron en vue de leur acclimatation.

### 20 5-3 Mode préféré pour les construits barnase : re-transformation de cals act-barstar

Les construits chimériques barnase décrits à l'exemple 3 peuvent être utilisés pour des transformations classiques selon l'une ou l'autre des techniques décrites précédemment.

Selon un mode préféré, adapté au caractère toxique de la  
25 barnase, on utilise pour la transformation des cals pré-transformés contenant le gène barstar, qui code pour un inhibiteur spécifique de la Barnase (Hartley, 1988). Ce gène sert de 'protection' pendant le processus de régénération de ces cals, qui se fait essentiellement à partir de l'embryogénèse chez le maïs.

- étape a : obtention d'une lignée exprimant le barstar et un  
30 plasmide contenant le gène de résistance à l'hygromycine : Une première étape de transformation est réalisée selon l'un des protocoles décrits, avec le plasmide pWP280 contenant la cassette pActin-intron~Barstar~Nos poly A.

Cette cassette a été obtenue selon les étapes suivantes : le fragment barnase a été amplifié par PCR à partir du plasmide pTG2 (Horovitz et al, 1990) puis sous-cloné en tant que fragment Xba1/HindIII dans le plasmide pBluescript KS+ (Stratagene) donnant le plasmide pWP118.

5 Le gène barstar a ensuite été transféré en tant que fragment Xba1/HincII dans un site Xba1/SmaI du plasmide pW90, dérivé du plasmide pJIT30 décrit par Guerineau et al (1990) (promoteur 35SCaMV remplacé par le promoteur double 35S et la région *polylinker* entre les sites Xba1 et EcoR1 remplacée par les sites Spe1, BamH1, Sma1 et Pst1).

10 La région polyA CaMV du plasmide obtenu est remplacée par la région nos polyA de pED23 (Dale et al, 1991) formant le plasmide pWP266. La région promotrice double 35S CaMV est enfin remplacée par le promoteur actine du riz et l'intron issu de pCOR113 (Mc Elroy et al, 1991) formant le plasmide pWP280 (figure 10).

15 Les plantes "promoteur actine~barstar" ainsi produites sont analysées par Northern Blot pour identifier les plantes exprimant correctement l'ARNm codant pour Barstar. Les plantes ainsi produites fournissent des embryons exprimant le gène Barstar, qui serviront à la production de cals de type II selon les techniques connues : mise en culture des embryons sur milieu  
20 d'induction de la callogénèse et repiquage sur milieu sélectif contenant de l'hygromycine.

- étape b : transformation de ces cals avec le construit chimérique barnase :

25 Les cals act-barstar obtenus à l'étape précédente sont ensuite bombardés selon la technique décrite au point 5-1 par les construits 'promoteur Esr~barnase' précédemment décrits avec un plasmide conférant la résistance au Basta (pDM302, Mc Elroy et al, 1991). On sépare ensuite les deux gènes dans la descendance par ségrégation, pour voir l'effet du seul construit  
30 promoteur Esr~barnase.

De meilleurs résultats, notamment en ce qui concerne l'efficacité de transformation et le nombre de plantes régénérées, ont été obtenus selon



ce mode préféré, en comparaison à la technique classique qui vise à transformer directement les cals par les construits 'Esr~barnase'.

5

**EXEMPLE 6 :****Mise en évidence de la fonctionnalité des séquences promotrices (cas des construits GUS)**

Afin de détecter l'activité  $\beta$ -glucuronidase, les grains de maïs issus de plantes transformées par le canon à particules sont récoltés à des stades précis du développement et coupés le long de l'axe longitudinal. Ils sont  
10 incubés en présence de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-glucuronic acid (X-GlcA, Duchefa), à 37°C pendant 24 heures (Jefferson et al., 1987).

Dans le cas de construit Esr2-Gus notamment, la coloration bleue est délimitée au contour de l'embryon au 4<sup>ème</sup> et 5<sup>ème</sup> jour après pollinisation,  
15 puis seulement au niveau suspenseur les 6<sup>ème</sup> et 7<sup>ème</sup> jours, et enfin à la base du suspenseur aux jours 9,12, 13 et 15.

Ces résultats d'expression dans les plantes transgéniques démontrent que les fragments 5' décrits dans la présente invention correspondent à des promoteurs fonctionnels et qu'ils sont suffisants pour une  
20 expression spatio-temporelle correcte, en accord avec les résultats antérieurs de Opsahl et al (1997).

L'utilisation de ces séquences nucléotidiques promotrices dans des constructions moléculaires destinées à améliorer la qualité agronomique, alimentaire ou industrielle d'une plante, est particulièrement intéressante pour  
25 modifier la taille de l'embryon ou de l'albumen et/ou son développement.

BIBLIOGRAPHIE

- Armstrong (1994). *Maize Handbook* ; Freeling M., Walbot V.  
Eds ; 665-671.
- 5        - Barloy, D., et coll., (1989). *Maydica*, 34, 303-308.
- Becker, H. A., et al., (1999). *Domains of gene expression in  
developing endosperm*. 361-375
- Breton, C., et al., (1995). *Plant. Mol. Biol.* 27, 105-113.
- Christensen et al., (1996), *Transgenic Res.*, 5 : 213.
- 10       - Clark, J. K., et Sheridan, W. F. (1986). *J. Heredity*. 77, 83-92.
- Dale et al, (1990) *Gene* 91:79-85
- Davis, R. W., et coll., (1990). *Can. J. Bot.* 68, 471-479.
- Dennis, (1884), *Nucl. Ac. Res.*, 12 : 3983-4000.
- Devic et al., (1997), *Plant Physiol. Biochem.*, 35 : 35(4) : 331-  
15    339
- Finer J., (1992). *Plant Cell Report*, 11 : 323-328.
- Gerdes, J. T., et Tracy, W. F.(1993). *Crop Sci.* 33, 334-337.
- Guerche et al, (1987). *Mol. Gen. Genet.* 206:382
- Guerineau et al, (1990), *Plant. Mol. Biol.* 15:127-136
- 20       - Hartley et al., (1988), *J. Mol. Biol.*, 202, 913-915.
- Heidekamp F. et al, (1983), *Nucl Acids Res* 11, 6211-6223.
- Horovitz et al, (1990), *J. Mol. Biol.* 216:1031-1044
- Hu et al., (1995), *Molecular and General Genetics*, 248:471-480
- Hueros, G., et al., (1995). *Plant Cell*, 7, 747-757.
- 25       - Ishida et al., (1996), *Nature Biotechnology*, 14 :745-750
- Jefferson et al., (1987), *Plant Molecular Biology Reporter*, 5(4) :  
387-405
- Klein, (1987). *Nature*, 327 : 70-73.
- Kowles, R. V., et Phillips, R. L., (1988). *Int. Rev. Cytol.* 112, 97-  
30    136.
- Kyle, D. J., et Styles, E. D., (1977). *Planta*. 137, 185-193
- Liang, P., et Pardee, A. B., (1992). *Science*, 257, 967-971.
- Lopes, M. A., et Larkins, B. A., (1993). *Plant Cell*, 5, 1383-1399.

- Mariani et al. (1990), *Nature* 347, 737-741.
- Mc Elroy et al, (1991) *Mol. Gen. Genet.* 231:150-160
- McElroy et al., *Plant Cell*, 2 : 163-171, 1990.
- Odell et al., (1985), *Nature* 313 : 810-812.
- 5 - Opsahl-Ferstad, H. D., et al., (1997). *The Plant J.*, 12, 235-246.
- Poole et al., (1985), *Cell*, 40 :37-43
- Sambrook et al., (1989), *Molecular Cloning – A laboratory manual ; Cold Spring Harbor Laboratory Press*
- Schel, J. H. N., et coll., (1984). *Can. J. Bot.* 62, 2842-2856.
- 10 - Scott et al, (1992), demande de brevet WO 92/11 379
- Siemering KR. et al., (1996), *Current Biology* 6, 1653-1663
- Twell D. et al., *Development* 109, 705-713, 1990
- Vain et al., (1989). *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 18 :  
143-151.
- 15 - Xu, J., et al., (1995). *Plant Physiol.* 108, 1293-1294.
- Zhang et al, (1995). The effect of auxin on cytokinin levels and  
metabolism in transgenic tobacco tissue an *ipt* gene. *Planta* 196:84-94
- Zhang et al, (1996). Expression of the isopentenyl transferase  
gene is regulated by auxin in transgenic tobacco tissues, *Transgenic Res.* 5:57-  
20 65.

## REVENDICATIONS

5

1. Séquence nucléotidique promotrice isolée permettant une expression des séquences codantes auxquelles elle est liée, ladite expression étant i) spécifique de la région de l'albumen entourant l'embryon dans les graines des Angiospermes et ii) intervenant en particulier dans les stades précoces du développement de l'albumen.  
10
2. Séquence nucléotidique promotrice selon la revendication 1, isolée à partir de céréales, notamment de maïs.
- 15 3. Séquence nucléotidique promotrice selon l'une quelconque des revendications 1 ou 2, comprenant une séquence choisie parmi les séquences SEQ ID n°1, n°2, n°3, n°4, n°5, n°6 ou n° 7, ou toute séquence homologue de celles-ci.
- 20 4. Séquence nucléotidique promotrice selon l'une quelconque des revendications précédentes, comprenant en outre un élément régulateur en *cis* défini par le motif CTACACCA, de préférence répété en tandem.
5. Cassette d'expression comprenant une séquence nucléotidique promotrice  
25 selon l'une quelconque des revendications précédentes, liée de manière opérante à au moins un gène d'intérêt.
6. Cassette d'expression selon la revendication 5, dans laquelle le gène d'intérêt code pour une protéine choisie parmi une protéine impliquée dans  
30 le développement de l'embryon et/ou de l'albumen, la croissance cellulaire, le métabolisme des sucres ou celui des acides gras, une protéine toxique, et une protéine inhibitrice de la transcription.

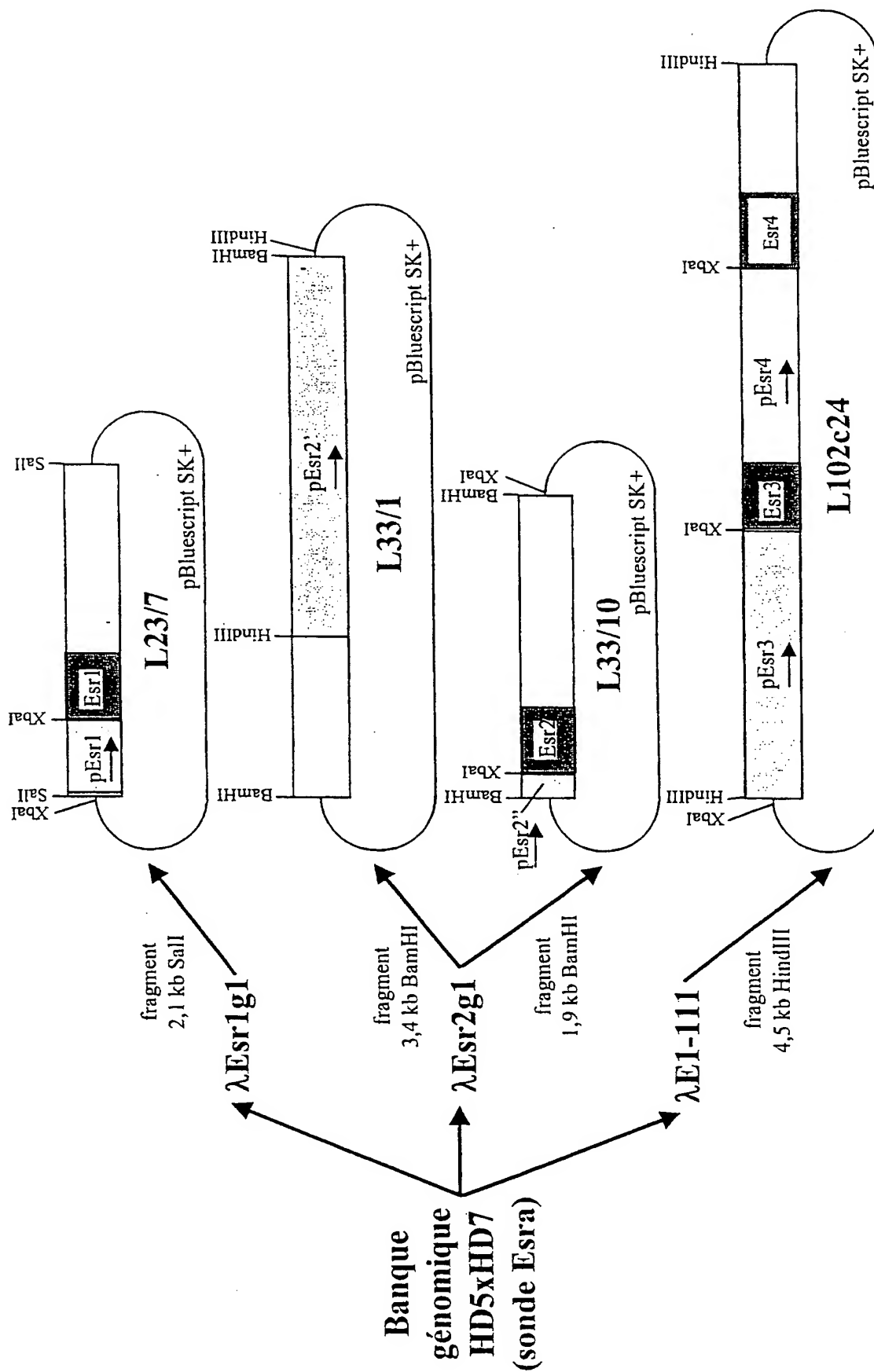
7. Cassette d'expression selon l'une quelconque des revendications 5 ou 6, dans laquelle le gène d'intérêt code pour une protéine choisie parmi la barnase ou l'isopentényltransférase.
- 5 8. Vecteur d'expression contenant une cassette d'expression selon l'une quelconque des revendications 5 à 7.
9. Cellule hôte de plante Angiosperme, notamment de céréale, transformée par un vecteur selon la revendication 8.
- 10 10. Plante transgénique ou partie de plante transgénique, notamment fruit, semence, grain, pollen, générée à partir d'une cellule selon la revendication 9.
- 15 11. Plante ou partie de plante selon la revendication 10, caractérisée en ce qu'il s'agit d'une céréale ou d'une plante oléagineuse, choisie notamment parmi le maïs, le blé, le colza, le tournesol, préférentiellement le maïs.
- 20 12. Plante transgénique hybride obtenue par croisement de plantes telles que définies dans l'une quelconque des revendications 10 ou 11.
13. Procédé d'obtention d'une plante Angiosperme présentant des qualités agronomiques ou nutritionnelles améliorées, comprenant les étapes consistant à :
  - 25 - transformer au moins une cellule de plante Angiosperme par un vecteur selon la revendication 8 ;
  - cultiver la cellule ainsi transformée de manière à générer une plante contenant dans son génome une cassette d'expression selon l'une quelconque des revendications 5 à 7.
- 30 14. Utilisation d'une cassette d'expression telle que définie dans l'une quelconque des revendications 5 à 7, pour l'obtention de plante

Angiosperme transgénique présentant des qualités agronomiques ou nutritionnelles améliorées.

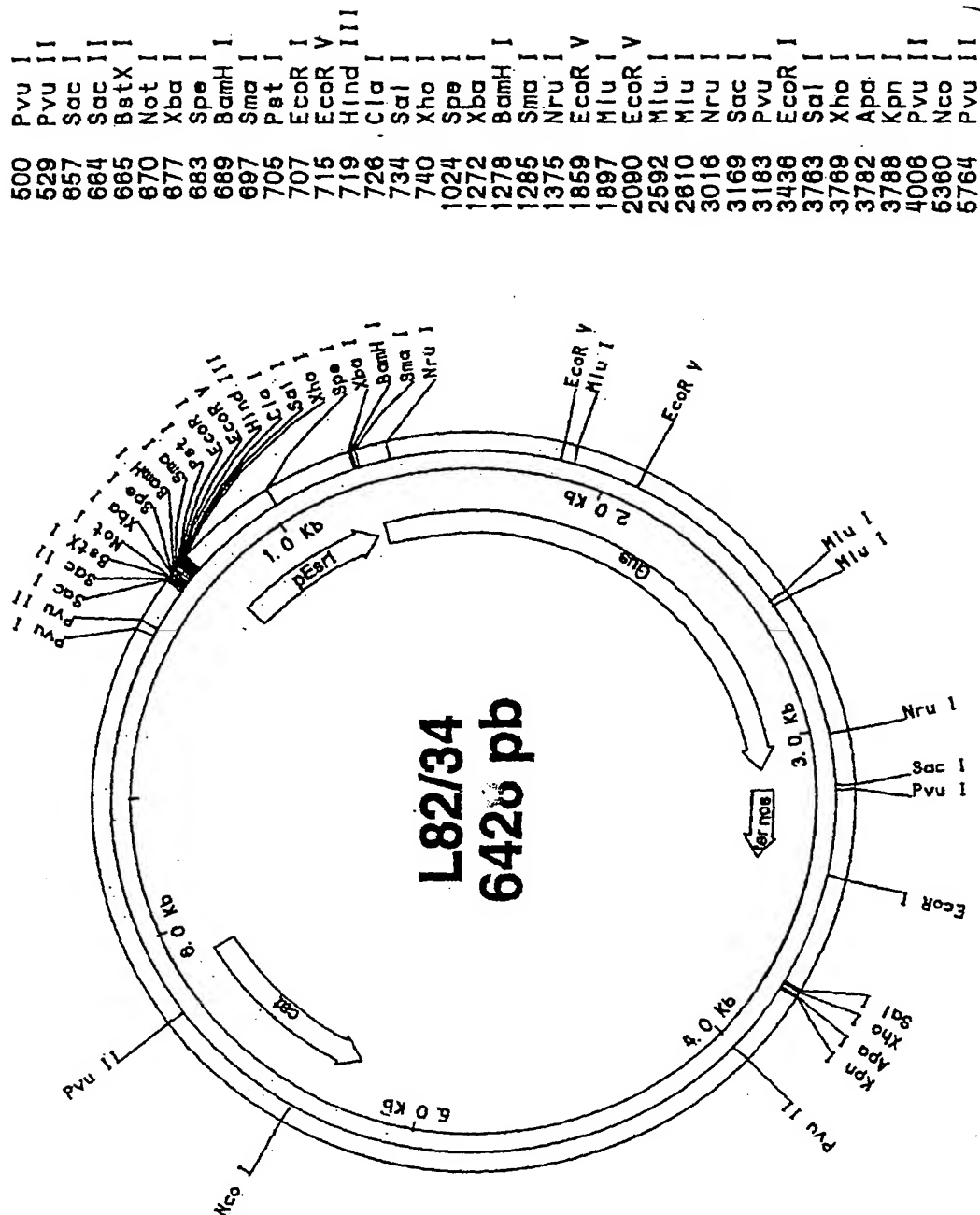
5 15. Utilisation selon la revendication 14, pour l'obtention d'une plante transgénique productrice de graines à teneurs en amidon ou en huile modifiées en comparaison avec une plante non transformée.

10 16. Utilisation de plante ou partie de plante, notamment semence, grain et fruit, telle que définie dans l'une quelconque des revendications 10 à 12, pour la préparation de produits dérivés, notamment de produits alimentaires.

1/11



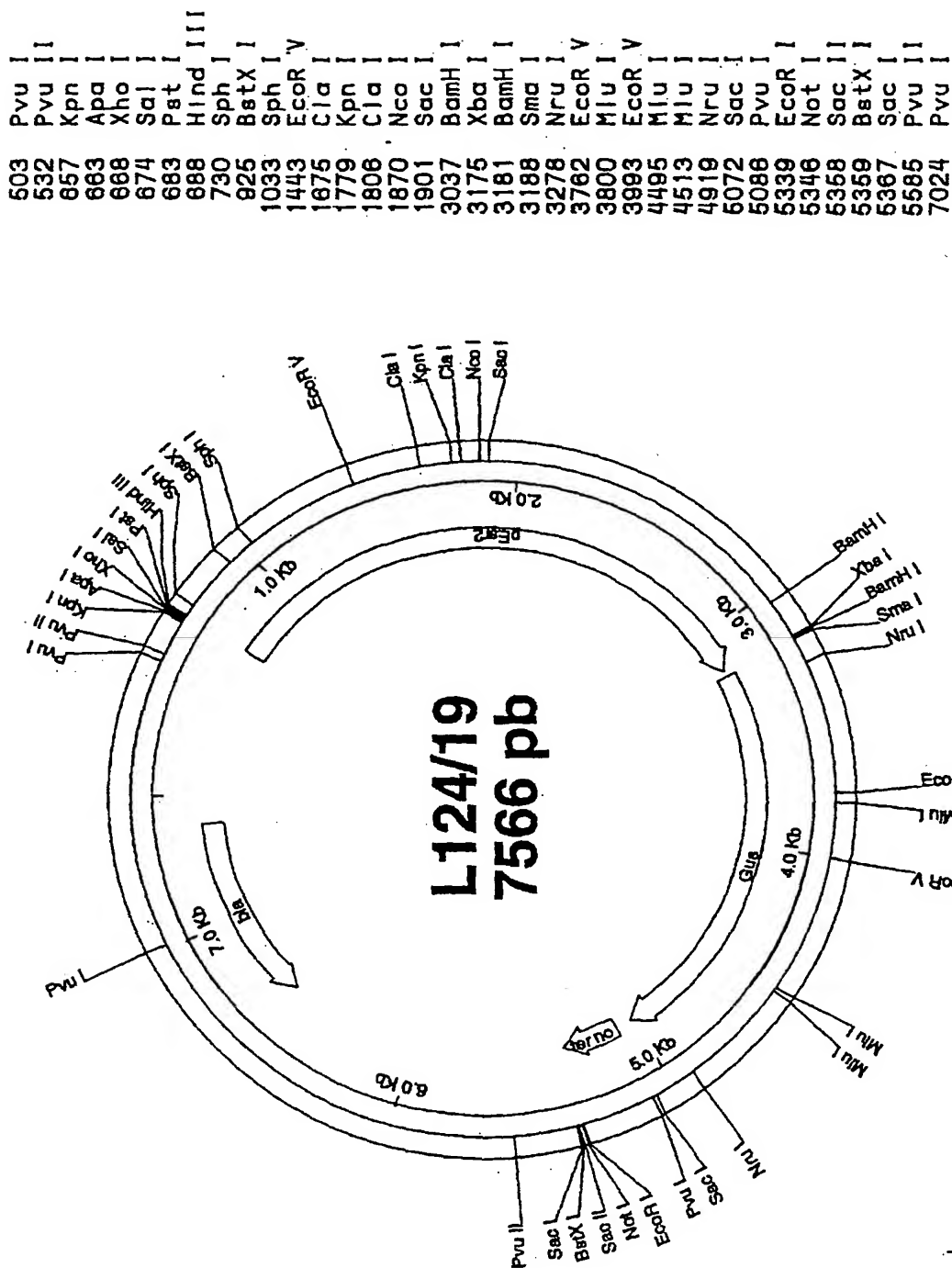
**FIG.1**



**FIG. 2**

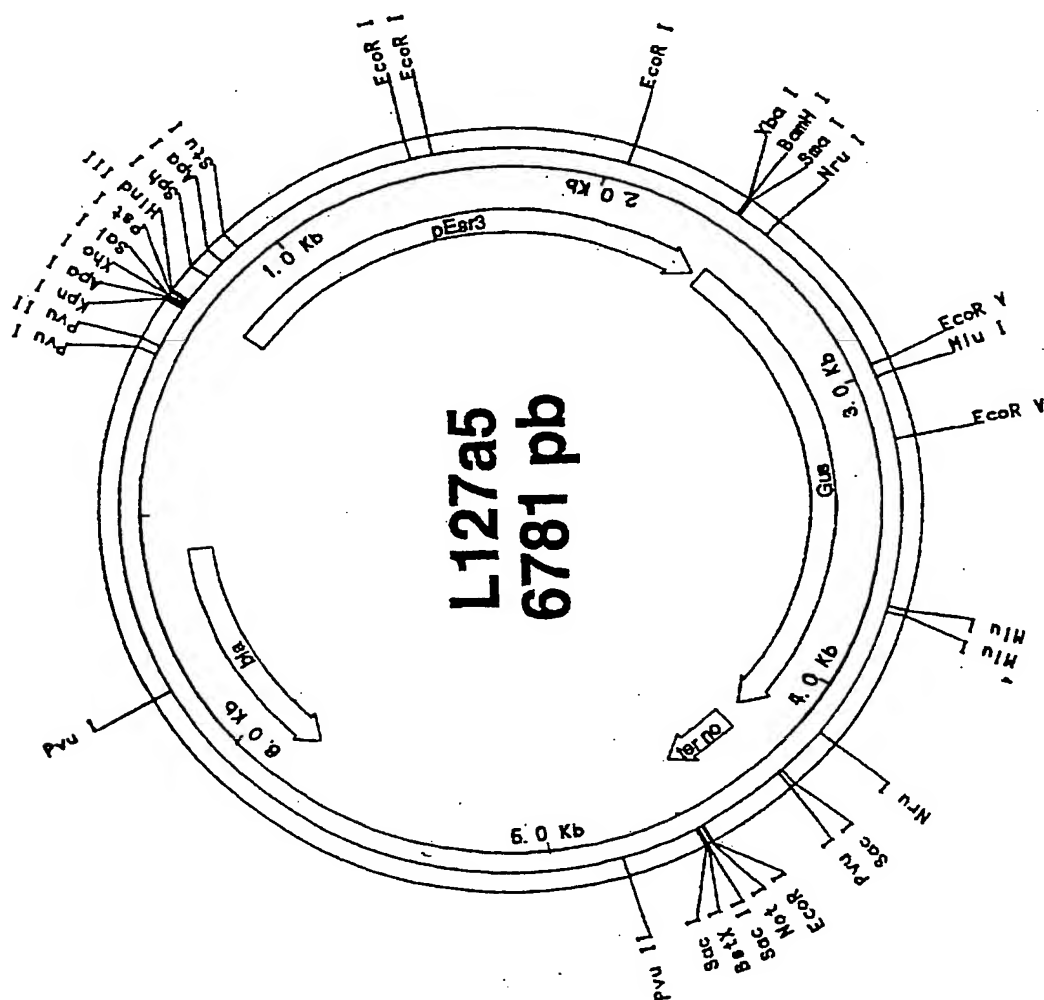


3/11



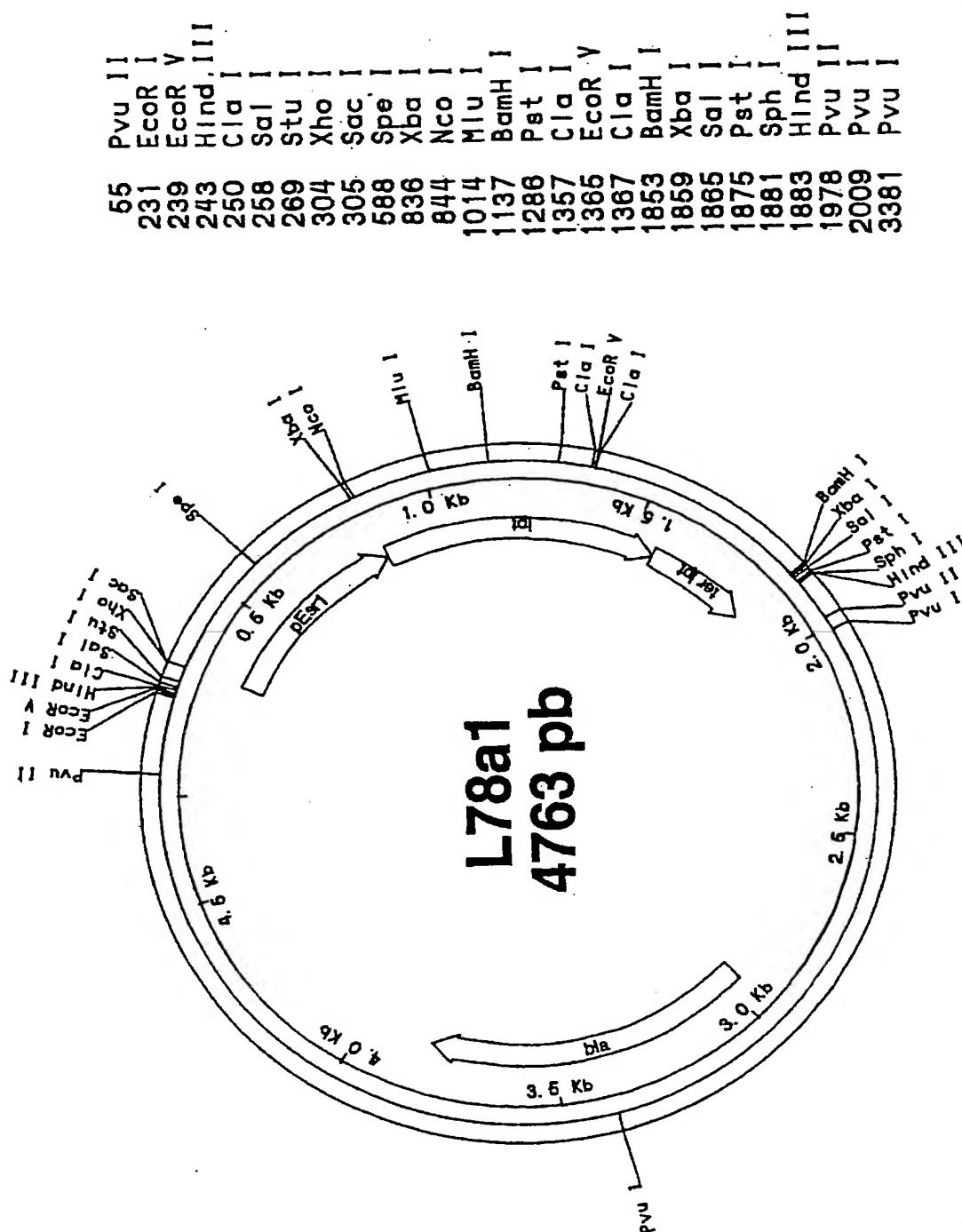
**FIG.3**

503	Pvu I	I
532	Pvu II	II
657	Kpn I	I
663	Apa I	I
668	Xho I	I
674	Sal I	I
683	Pst I	I
688	Hind III	III
777	Sph I	I
837	Apa I	I
902	Stu I	I
1450	EcoR I	I
1509	EcoR I	I
2053	EcoR I	I
2390	Xba I	I
2396	BamH I	I
2403	Sma I	I
2493	Nru I	I
2977	EcoR V	V
3016	Mlu I	I
3208	EcoR V	V
3710	Mlu I	I
3728	Mlu I	I
4134	Nru I	I
4287	Sac I	I
4301	Pvu I	I
4554	EcoR I	I
4561	Not I	I
4573	Sac II	II
4574	BstX I	I
4582	Sac I	I
4800	Pvu II	II
6239	Pvu I	I



**FIG. 4**

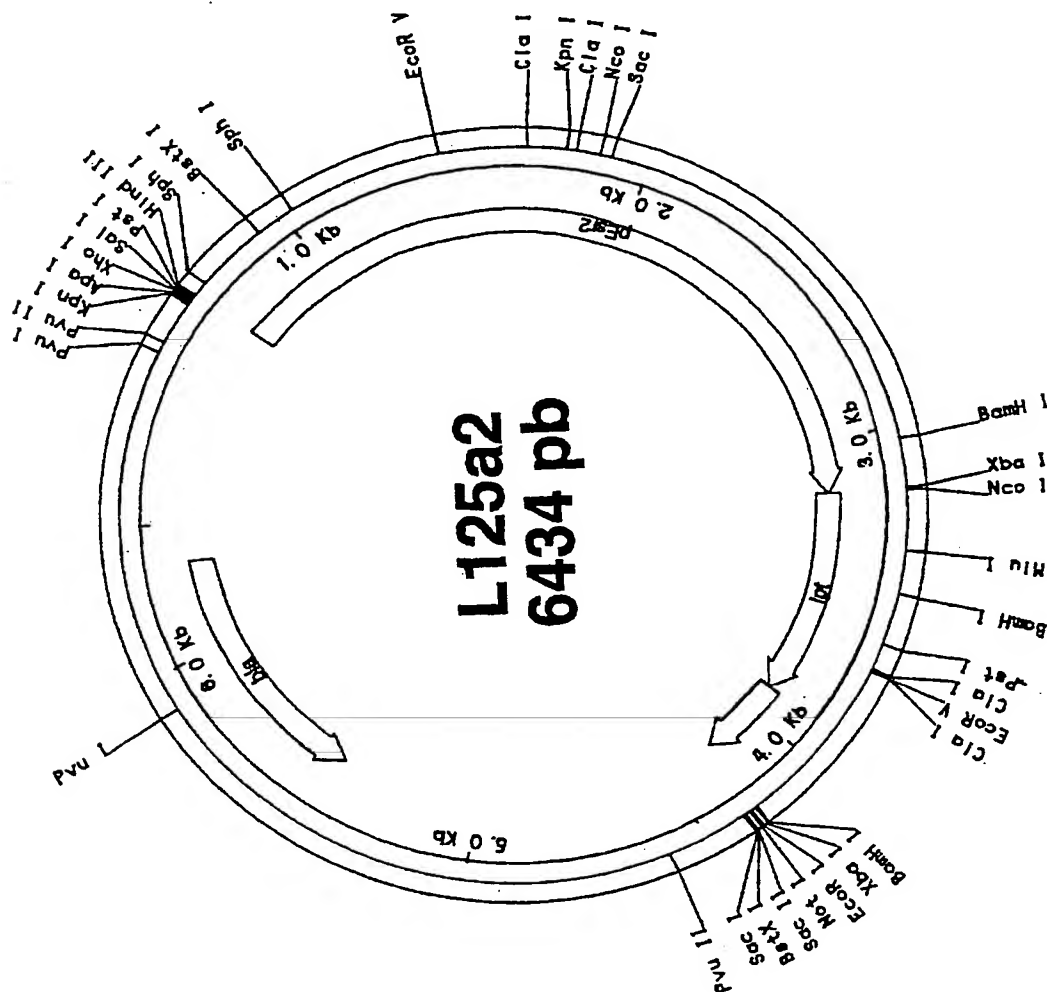
5/11



**FIG.5**

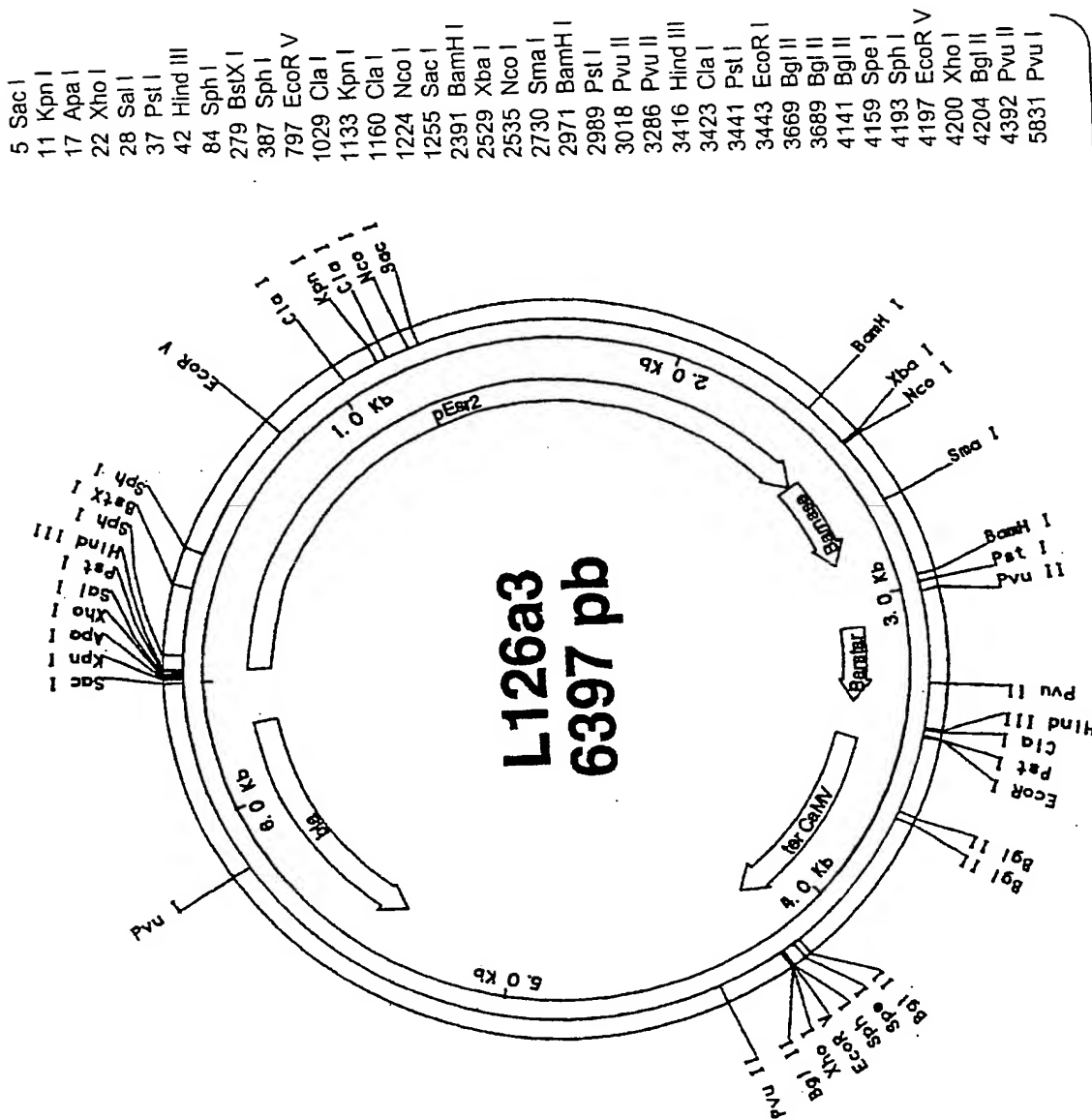
6/11

503 Pvu I  
532 Pvu II  
557 Kpn I  
663 Apa I  
668 Xho I  
674 Sal I  
683 Pst I  
688 Hind III  
730 Sph I  
925 BstX I  
1033 Sph I  
1443 EcoR V  
1675 Cla I  
1779 Kpn I  
1808 Cla I  
1870 Nco I  
1901 Sac I  
3037 BamH I  
3175 Xba I  
3183 Nco I  
3353 Mlu I  
3476 BamH I  
3625 Pst I  
3698 Cla I  
3704 EcoR V  
3708 Cla I  
4192 BamH I  
4198 Xba I  
4207 EcoR I  
4214 Not I  
4226 Sac II  
4227 BstX I  
4235 Sac I  
4453 Pvu II  
5892 Pvu I



**FIG.6**



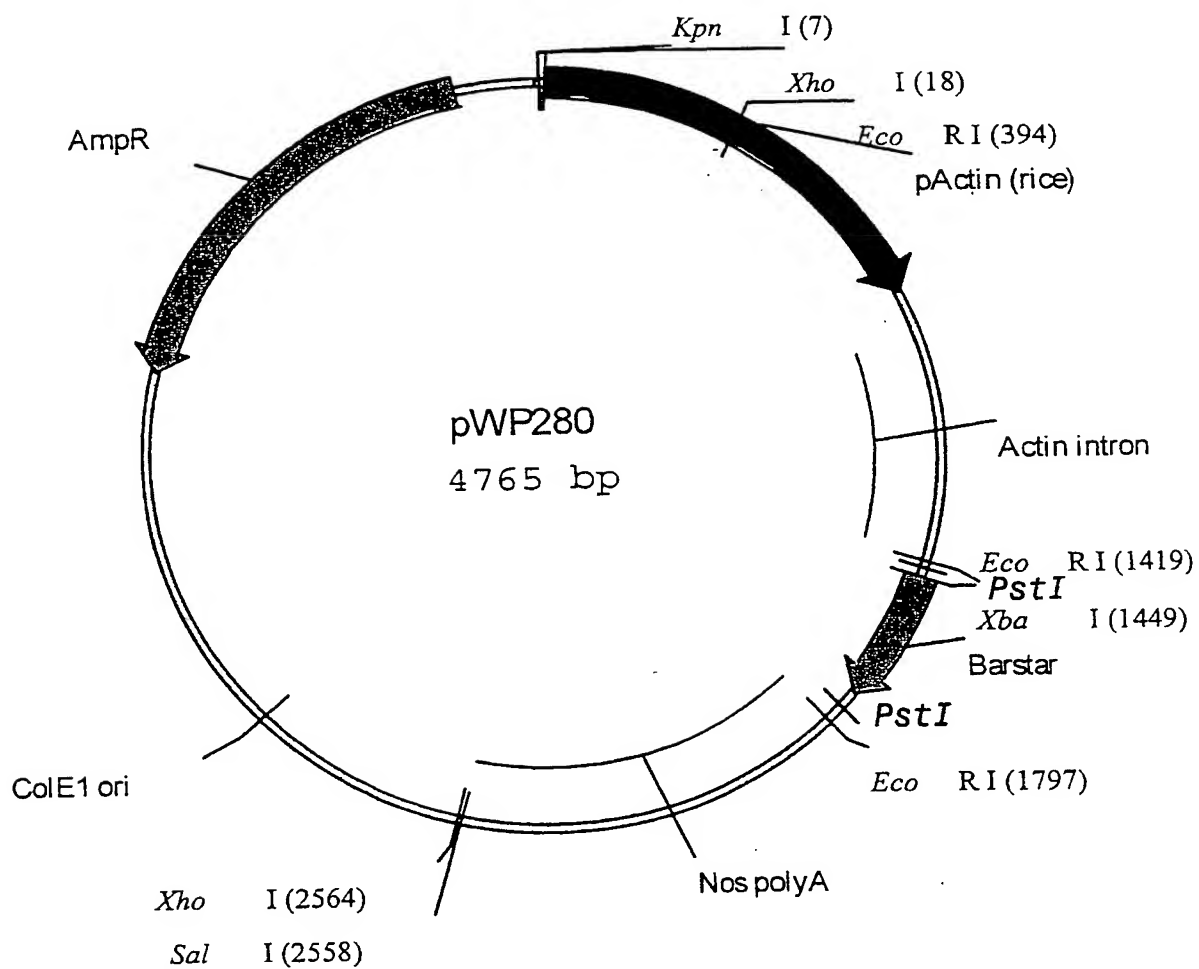
**FIG.8**

[illegible]

**FIG.9**

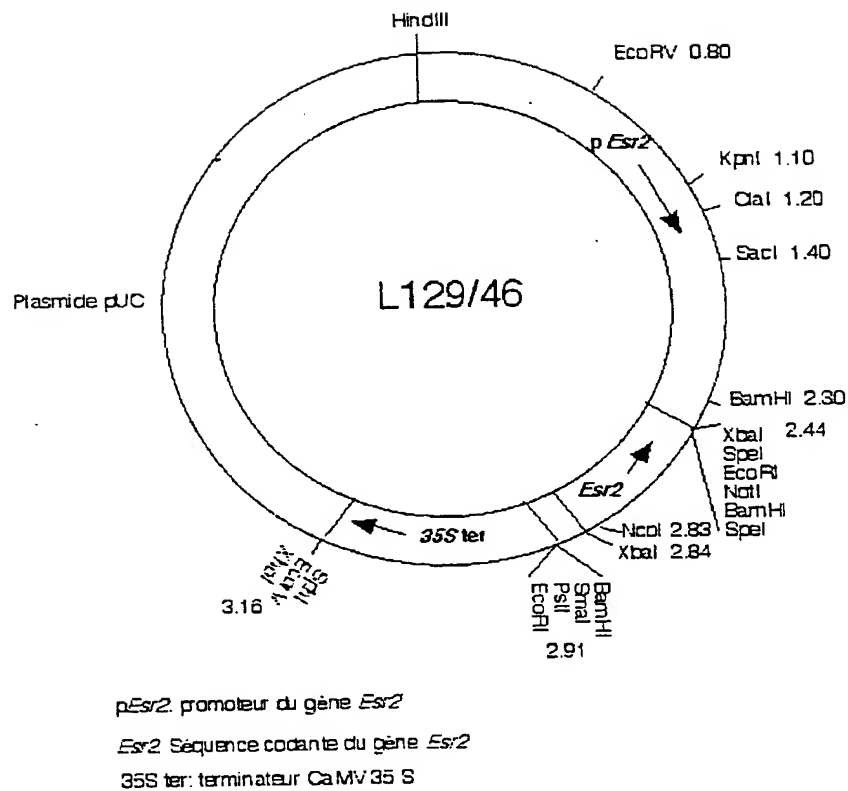
Répétition CTACACC en tandem  
 Répétition TTTTA    Répétition ATTCT

10/11

**FIG.10**



11/11

**FIG.11**